

慢性腎臓病発症閉経モデルラットにおける 酸化障害，抗酸化能に対する 食餌アーモンドペースト投与の影響

海老沢秀道・渡辺睦行・島 知世
都築公子・江草信太郎・飯野久和

Effects on Oxidative Damage and Anti-oxidative Ability of Dietary Almond Paste in Menopausal Model Rats with Chronic Kidney Disease (CKD)

Hidemichi EBISAWA, Nakamichi WATANABE, Tomoyo SHIMA,
Kimiko TSUZUKI, Shintaro EGUSA and Hisakazu IINO

The present study was carried out to find out the protective effects on oxidation disorders in menopausal model rats with chronic kidney disease (CKD) of a diet supplemented with almond paste. Nine-week-old female rats were divided into 3 groups: Control, AL, and Intact groups. The rats in the Control group and the rats in the AL group received 360 mg/kg BW of adenine intragastrically for 4 consecutive days so that they would develop CKD. After 7 days of recovery, the 3 groups of rats received ovariectomies (OVX) under anesthesia.

Beginning three days after the OVX, for 8 weeks, the rats were given 13g per day of 20% casein protein diet supplemented with 0% almond paste (for the Control group and the Intact group) or 0.5% almond paste (for AL group). All the rats were killed under anesthesia and their TBARS in liver and kidney, BAP and dROM in serum, and some biochemical parameters in serum and urine were measured and the values of the AL group and the Control group were compared.

Both groups showed 1) no significant differences in body weight changes, organ weights and blood analyses. The AL group showed 2) 22% lower value in serum creatinine concentration, 3) 28.5% higher value in creatinine clearance, 4) significantly higher value of TBARS in the liver. And the two groups showed 5) no significant differences in BAP and d-ROM values.

From the above results, the authors conclude that the almond paste supplemented diet did not have significant influence on the degrees of the lipid peroxidation, the oxidation stress and the anti-oxidation ability of the menopausal model rats with CKD used in this study. On the other hand, it may be possible to improve renal function in menopausal model rats with CKD using a diet supplemented with almond paste.

Key words: menopausal model rats with chronic kidney disease (慢性腎臓病閉経モデルラット), oxidative damage (酸化障害), anti-oxidative ability (抗酸化能), lipid peroxidation (脂質過酸化), almond paste (アーモンドペースト)

序 論

腎臓は、体液の恒常性維持のための必須臓器で、加齢による機能低下の著しい臓器である。加齢に加えて様々な原因によって機能ネフロン数が徐々に減少し続けると、最終的に、慢性腎臓病（CKD）と呼ばれる慢性的に進行する腎機能低下状態に陥る。CKD 発症腎臓では酸化障害が促進されており、病態進行の要因になっている。

一方中年期以降の女性は、閉経による急激なエストロゲン欠乏状態に由来する脂質代謝異常や骨代謝異常発症のリスクが高まっている。

CKD 治療や閉経後代謝異常に対する治療法や症状軽減のための方策は明らかにされているが、両者を併せ持つケースすなわち CKD 患者が閉経を迎えた時に摂取すべき食事についてはほとんど研究されていない。

アーモンドは、脂質、タンパク質、無機質などの他、ビタミン E を高濃度含有する種実類としてよく知られている。ビタミン E は活性酸素消去能を示し、脂質過酸化等に対して抑制的に作用することから、アーモンドは抗酸化能を有する食品として注目されている¹⁾。しかし、アーモンドの抗酸化能に関する研究は種皮を用いており^{2,3)}、種実そのものの抗酸化能を評価した研究は殆ど無い。

本研究は、閉経を迎えた慢性腎臓病発症患者の病態の進行抑制と代謝異常の改善を目的とした食事条件を明らかにするための基礎研究である。

今回は、アーモンド種実を原材料として製造されたアーモンドペーストを慢性腎臓病-閉経モデルラットに与え、酸化障害、抗酸化能に対する有効性の有無を評価した。

実験方法

1. 実験動物及び飼育条件

実験動物は、9 週齢の Wistar/ST 雌ラットを用いた（三協ラボサービス（株））。ラットは、個別ケージに入れ、12 時間明暗サイクルをもった動物飼育室内で飼育した。

慢性腎臓病モデルの作成

ラットは、1 群 6~7 匹として、平均体重及び標準偏差が等しくなるように 3 群（Cont 群、AL 群、Intact 群）に分けた。Cont 群と AL 群には先行研究⁴⁾に従ってアデニンを 2%メチルセルロース懸濁液として連続 4 日間胃内投与し、慢性腎臓病モデルラットを作成した。Intact 群には、2%メチルセルロース水溶液のみ胃内投与して、アデニン投与条件に対する対照とした。アデニン投与中に、AL 群に割り当てたラットの内 2 匹が死亡した。その結果、実験群におけるラット例数は Cont 群 6 匹、AL 群 4 匹、Intact 群 7 匹となった。

本研究条件では、作成した CKD モデルラットは、腎障害から回復し、体重増加も可能である^{4,5)}。

閉経モデルの作成

アデニンあるいは 2%メチルセルロース胃内投与終了後、体重の回復を図るため、市販固形食（CRF-1）を 7 日間自由に摂取させた。その後、全てのラットに対して麻酔下に卵巣摘出手術（OVX）を行い、閉経モデルを作成した。

2. 食餌条件

卵巣摘除手術後 3 日目から、ラットに、Table 1. に示した実験食のいずれかを与えた。すなわち、Cont 群にはコントロール食として AIN76 をベースとし

Table 1. Compositions of experimental diet

| Groups | Cont | AL | Intact |
|-----------------------|-------|-------|--------|
| Ingredients | | | |
| Almond paste | 0 | 5 | 0 |
| Casein ¹ | 220 | 220 | 220 |
| α -Corn starch | 406.7 | 403.3 | 406.5 |
| Sucrose | 203.3 | 201.7 | 203.3 |
| Cellulose powder | 50 | 50 | 50 |
| Mineral mixture | 50 | 50 | 50 |
| Vitamin mixture | 20 | 20 | 20 |
| Corn oil | 50 | 50 | 50 |
| Total amount (g) | 1000 | 1000 | 1000 |

¹ Protein content: 85%.

Almond paste: Purchased from Marusanai Co. LTD., Japan.

た 20%カゼインタンパク質食 (20CA) を、AL 群には 20CA に 0.5%アーモンドペースト添加食を与えた。この量は体重 1 kg 当たり 0.28 g (体重 53 kg では 15 g) のアーモンド摂取に相当する。Intact 群には Cont 群と同じ飼料を与えた。実験食は、食べこぼしを避けるため蒸留水で捏ねた団子状として与え、1 日 13 g の制限食条件で 2 ヶ月間投与した。水は、水道水を自由に与えた。

本研究で用いた飼料投与量は、摂食量の違いによる影響を排除するために、成熟期ラットが生涯に亘って摂取出来る最大量である 13 g/日とした。このような制限食条件においてもビタミン及びミネラルの不足が起こらないようこれら栄養素の含有量をそれぞれ 2%及び 5%に設定した。またこの処置は、腎機能低下による再吸収や濾過機能の異常に伴うこれら栄養素の損失分を補う事にもつながっている。

なお、アーモンドペーストは、アーモンドミルク製造における原材料で、(株) マルサンアイから無償提供されたものである。本研究で使用したアーモンドペースト 100 g 当たりの栄養素含有量は、日本食品分析センターへの依頼分析の結果、エネルギー、タンパク質、脂質、炭水化物及び α トコフェロール (ビタミン E) はそれぞれ 658 kcal, 21.3 g, 58.9 g, 14.7 g および 24.8 mg であった。

3. 採 尿

飼育期間の期末 3 日間、代謝ケージを用いて、72 時間尿を採取した。

4. 屠殺条件

飼育期間終了後、ラットをソムノペンチル麻酔下 (1 ml/kg BW) で、採血屠殺した。屠殺後直ちに、臓器を摘出し、重量を測定した。

絶食等の処置は行わなかった。

5. 生体試料の採取

血液は、ヘマトクリット値測定後血清を分離し、生化学検査項目及び抗酸化能 (BAP)、酸化ストレスの程度 (dROM) の測定に用いるため、液体窒素で凍結後、 -40°C で保存した。

肝臓及び腎臓は、過酸化脂質量定量 (TBARS) のため、液体窒素で凍結後、 -40°C で保存した。

6. 血液分析

血清を用いて血液生化学検査項目を測定した。測定項目は、総タンパク質 (TP)、アルブミン (ALB)、クレアチン (Cr)、尿素窒素 (BUN) 及び ALT/AST とした。

7. 酸化ストレスの有無の評価

慢性腎臓病発症腎臓内では活性酸素や過酸化物による内皮細胞の炎症が発症している⁶⁾。酸化ストレスの有無及びその程度を評価するために腎臓中の過酸化脂質及び血清中の BAP (Biological Antioxidant Potential) 及び d-ROM (Diacron-Reactive Oxygen Metabolites) をそれぞれ BAP テスト ((株) ウィスマー) 及び d-ROM テスト ((株) ウィスマー) を用いて測定した。

過酸化脂質量は、肝臓及び腎臓のホモジネートを調整した後、松永の報告に従ってチオバルビツール酸反応物総量として測定した⁷⁾。

8. 統計処理

数値は平均値±標準偏差として表記した。

得られた測定結果は、Cont 群、AL 群及び Intact 群について一元配置分散分析を行い、有意となった場合は Tukey の多重比較検定を行った。 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

9. 倫理的配慮

本研究は、昭和女子大学実験動物委員会の承認を得て実施された。

結果と考察

1. 摂食量及び体重変化

摂食量

実験食期間中、ラットは与えられた飼料のほとんど全てを摂取した。その結果 1 日当たりの平均摂食量は全ての群において 13.0 g となった。

Table 2. Food consumption, initial and final body weight and body weight gain

| Group | n | Food consumption | Body weight | | |
|--------|---|-----------------------|-------------|--------|-------------------|
| | | | Initial | Final | Gain ¹ |
| | | g/day | | g | |
| Cont | 6 | 13.0±0.0 ² | 224±8 | 266±5 | 42±7 |
| AL | 4 | 13.0±0.0 | 229±15 | 261±12 | 32±5 |
| Intact | 7 | 13.0±0.0 | 234±9 | 265±5 | 31±8 |

¹ Body weight gain calculated as final minus initial body weight.

² Mean±SD.

No significant differences were observed among three groups.

Table 3. Organ weights

| Group | n | Liver | Kidney | Adrenal G. | Heart | Uterus |
|--------|---|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | g/kg BW | g/kg BW | mg/kg BW | g/kg BW | g/kg BW |
| Cont | 6 | 24.8±3.7 ^a | 3.60±0.27 ^b | 0.21±0.02 ^a | 2.94±0.18 ^a | 0.50±0.16 ^a |
| AL | 4 | 26.0±1.6 ^a | 3.65±0.28 ^b | 0.22±0.03 ^a | 2.98±0.19 ^a | 0.49±0.06 ^a |
| Intact | 7 | 25.7±3.1 ^a | 2.90±0.27 ^a | 0.19±0.03 ^a | 2.91±0.16 ^a | 0.52±0.17 ^a |

Right kidney was measured.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups Cont, AL and Intact at p<0.05.

Values were mean±SD.

体重変化

実験食投与開始時及び終了時体重及び体重増加量を Table 2. に示した。

Cont 群及び AL 群ラットの体重は、アデニン胃内投与及び OVX 手術によって低下したがその後は増加に転じた。Intact 群に比べて、アデニン胃内投与後の Cont 群及び AL 群の体重は、実験期間を通して低値傾向を示した。

OVX 手術後 3 日目から実験食投与を開始した。実験食投与開始後 3 日間は OVX あるいは偽手術による侵襲のため体重は減少したが、それ以降は全てのラット体重は増加し、実験食投与開始時に比べて実験食期終了時には、Cont 群、AL 群及び Intact 群でそれぞれ 42±7 g 増加、32±5 g 増加及び 31±8 g 増加した。実験食開始時、終了時及び体重増加量は、いずれも、3 群の間に有意差は観察されなかった。

以上の通り、本研究でも、ラットは対照条件とほぼ同程度の体重増加が観察された^{4,5)}。

臓器肉眼所見

既報⁴⁾と同様、Intact 群に比べて、Cont 群の腎臓は全体的に淡い褐色を示し、粒状の斑点が見られるなど肉眼所見に異常が見られた。

Cont 群と AL 群の間には、腎臓の肉眼所見に明らかな相違は認められなかった。腎臓以外の肝臓、副腎及びその他の臓器には、明らかな異常所見は認められなかった。

臓器重量

Table 3. に臓器重量を示した。

腎重量は Intact 群に比べて Cont 群、AL 群で有意に増加し、アデニン投与によって腎臓が肥大したことが確認された。これは左右同様に見られた⁴⁾。肉眼所見と併せて、本研究で用いたラットは明らかな腎障害を発症していた。

一方、肝臓、心臓、副腎重量は、いずれも肥大及び萎縮は観察されず、またいずれの群間にも有意差は見られなかった。

Table 4. Blood analyses

| Group | n | T-prot | Albumin | ALT | AST |
|--------|---|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| | | g/100 ml | g/100 ml | Karmen | |
| Cont | 6 | 6.2±0.2 ^a | 3.2±0.1 ^a | 33.6±5.2 ^a | 8.0±1.0 ^a |
| AL | 4 | 6.3±0.7 ^a | 3.4±0.1 ^a | 30.7±5.0 ^a | 8.0±1.7 ^a |
| Intact | 7 | 6.0±1.1 ^a | 3.5±0.3 ^a | 28.4±4.8 ^a | 6.9±1.7 ^a |
| Group | n | Calcium | BUN | S-Creat | Hematocrit |
| | | mg/100 ml | mg/100 ml | mg/100 ml | % |
| Cont | 6 | 7.9±0.3 ^b | 14.2±1.3 ^a | 0.65±0.07 ^a | 46.0±3.03 ^a |
| AL | 4 | 8.1±0.4 ^{ab} | 14.8±0.6 ^a | 0.51±0.10 ^a | 47.8±0.84 ^a |
| Intact | 7 | 9.0±1.0 ^a | 11.7±4.7 ^a | 0.61±0.06 ^a | 44.5±7.15 ^a |

T-prot: Total protein. BUN: Blood urea-nitrogen.

S-Creat: Serum creatinine.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups Cont, AL and Intact at p<0.05.

Table 5. Urine analyses

| Group | n | U-prot | U-Creat | Ccr |
|--------|---|----------------------|------------------------|------------------------|
| | | mg/day | mg/day | ml/min |
| Cont | 6 | 4.5±2.3 ^a | 8.19±0.27 ^a | 0.89±0.11 ^a |
| AL | 4 | 3.0±1.7 ^a | 8.05±0.49 ^a | 1.12±0.22 ^a |
| Intact | 7 | 6.3±2.7 ^a | 8.12±0.56 ^a | 0.93±0.13 ^a |

U-prot: Urinary protein excretion.

U-Creat: Urinary creatinine excretion.

Ccr: Creatinine-clearance calculated from urinary and serum creatinine.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups Cont, AL and Intact at p<0.05.

血液生化学検査

血液生化学検査の結果を Table 4. に示した。

総タンパク質，アルブミン，ALT/AST 等はいずれも，全ての群で正常値を示し，アーモンドペースト投与はこれら血液生化学検査値に異常をもたらさなかった。

CKD モデルである Cont 群の血清カルシウム濃度は，正常な腎臓を持っている Intact 群のそれに比べて有意に低い値を示し，基準値より僅かに低い低カルシウム血症を示した。AL 群の血清カルシウム濃度は Cont 群とほぼ同値を示し，アーモンドペースト投与は血清カルシウム濃度に有意な影響を及ぼさなかった。

一方腎糸球体濾過率の低下を反映する血清クレアチニン濃度は，いずれの群も正常範囲を維持していた。しかし，Cont 群に比べて AL 群は 22% 低値傾

向を示し，アーモンドペースト投与は，腎機能低下に対して抑制的に作用する可能性が示された。

尿分析による腎機能評価

尿分析の結果を Table 5. に示した。

腎障害の発症によって，タンパク尿陽性，クレアチニンクリアランス値の低下などが観察される。

尿中タンパク質排泄量は全てのラットで生理的範囲の 10 mg/日以下の正常値を示した。糸球体濾過率を示すクレアチニンクリアランス値は，Intact 群と Cont 群ではほぼ同値を示し，本実験条件ラットは腎機能障害から回復しつつあることが推定された。一方 AL 群のクレアチニンクリアランス値は，有意とはならなかったが，Cont 群に比べて 28.5% 高値傾向を示した。

以上の結果から，アーモンドペースト添加食は本

Table 6. TBARS in Liver and Kidney

| Groups | n | Liver | Kidney |
|--------|---|------------------------|------------------------|
| | | nmole/g | nmole/g |
| Cont | 6 | 27.7±6.8 ^a | 24.8±6.8 ^{ab} |
| AL | 4 | 40.1±3.3 ^b | 20.9±2.2 ^a |
| Intact | 7 | 31.9±3.3 ^{ab} | 30.6±3.9 ^b |

TBARS: Thiobarbituric acid reactants.

Values were mean±SD.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups Cont, Al and Intact at p<0.05.

研究条件ラットの腎機能に対して利的効果を示す可能性が示された。しかし、その理由は不明である。

酸化障害関連指標

肝臓及び腎臓におけるチオバルビツール酸反応物を過酸化脂質として測定し、その結果を Table 6. に示した。

肝臓における TBARS は、Cont 群に比べて AL 群で有意に高い値を示した。腎臓における TBARS は、Cont 群に比べて AL 群は有意な相違を示さなかった。

アーモンド果実の栄養特性として、ビタミン E が比較的高濃度に含有されている事が挙げられる (Table 2.)。腎障害を発症し炎症反応が促進されていると予測される本研究条件ラット腎臓に対して、アーモンドペースト投与がビタミン E の抗酸化能を介して過酸化脂質生成を抑制する事が期待された¹⁾。しかし、Cont 群に比べて、AL 群の腎臓における過酸化脂質量の有意な低値は観察されなかった。一方肝臓における TBARS は、Cont 群に比べて AL 群は有意な高値を示し、アーモンドペースト投与によって過酸化脂質産生はむしろ高まる結果となった。肝臓における過酸化脂質産生の増加が何を意味するのかは不明である。

生体の抗酸化力及び酸化ストレスの程度を評価するために、血清中 BAP (Biological Antioxidant Potential) 及び d-ROM (Diacron-Reactive Oxygen Metabolites) を測定し、その結果を Table 7. に示した。

BAP は抗酸化力を反映し、2200 以上が最適、2000 以下は抗酸化力が不足していることを示す。

Table 7. BAP and dROM

| Groups | n | BAP | d-ROMs |
|--------|---|-----------------------|---------------------|
| | | μmol/L | U. CARR |
| Cont | 6 | 2599±830 ^a | 209±22 ^a |
| AL | 4 | 2749±100 ^a | 181±48 ^a |
| Intact | 7 | 2784±212 ^a | 182±45 ^a |

BAP: Biological antioxidant potential

dROM: Diacron reactive oxygen metabolites

U. CARR: Carratelli units

d-ROM はヒドロキシラジカルの量を反映し、200–300 が正常、321 以上は軽度の酸化ストレス、341 以上は中等度の酸化ストレスを受けていると評価される。

BAP は、いずれの群も 2200 以上の良好な値を示し、Cont 群と AL 群の間に有意差は観察されなかった。d-ROM は、全てのラットで 300 以下の正常値を示し、Cont 群と AL 群の間に有意差は観察されなかった。

以上の通り、肝臓及び腎臓中過酸化脂質量、抗酸化能及び酸化ストレスの程度のいずれに対しても、アーモンドペースト投与による利的効果は確認できなかった。

この理由として、本研究で用いたラットが腎障害誘導後の病態が回復可能なモデルであることから、8 週間の実験食期間の間に病態が安定して酸化ストレスから回復していることが推定される。しかし、本研究ではアデニン投与後の経日的観察を行っていないため、この可能性を確認することはできない。明らかにすべき今後の課題である。

謝 辞

本研究論文の作成にあたり、動物飼育や分析を行ってくれた昭和女子大学生活科学部管理栄養学科海老沢研究室所属の内沼直子、岡村佳奈、正保かおり、千須和仁美、中島嘉瑞、立仙祐美子の諸氏に感謝申し上げます。

本研究はマルサンアイ株式会社との共同研究として実施された。協力に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) David J. A. Jenkins, Cyril W. C. Kendall, Augustine Marchie, Andrea R. Josse, Tri H. Nguyen, Dorothea A. Faulkner, Karen G. Lapsley and Jeffrey Blumberg: Almonds reduce bio-markers of lipid peroxidation in older hyper-lipidemic subjects: J Nutr, 138; 908-913, 2008.
- 2) Maria Monagas, Ignacio Garrido, Rosa Lebrón-Aguilar, Begoña Bartolome and Carmen Gómez-Cordovés: Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols: J Agric Food Chem, 55; 8498-8507, 2007.
- 3) Huang WC, Chen CY, Wu SJ: Almond skin polyphenol extract inhibits inflammation and promotes lipolysis in differentiated 3T3-L1 adipocytes: J Med Food, 20; 103-109, 2017.
- 4) 間野琴子, 宮内智美, 春宮寛, 海老沢秀道: 慢性腎臓病モデルラットの骨密度維持に対する食餌アルギニンあるいは大豆イソフラボン抽出物投与の有効性評価に関する基礎的研究: 学苑・生活科学紀要, 866; 47-55, 2012.
- 5) Navid Shobeiri, Michael A. Adams and Rachel M. Holden: Vascular calcification in animal models of CKD. A review: Am J Nephrol, 31; 471-481, 2010.
- 6) Robert G. Fassett, Sree K. Venuthurupalli, Glenda C. Gobe, Jeff S. Coombes, Matthew A. Cooper and Wendy E. Hoy: Biomarkers in chronic kidney disease. A review: Kidney International, 80; 806-821, 2011.
- 7) 松永孝之: 酸化ストレス病態動物における抗酸化物質の効力の比較検討: 富山県薬事研究所年報, 40; 17-21, 2013.

(えびさわ ひでみち 管理栄養学科)

(わたなべ なかみち 健康デザイン学科)

(しま ともよ マルサンアイ株式会社研究開発室)

(つづき きみこ マルサンアイ株式会社生産統括部)

(えぐさ しんたろう マルサンアイ株式会社研究開発室)

(いいの ひさかず 管理栄養学科)